



**PENGARUH PEMBERIAN TIGA JENIS KOMBINASI
HERBAL A, B DAN C TERHADAP INDEKS FAGOSITOSIS
MAKROFAG DAN PRODUKSI ROI PADA MENCIT BALB/C**

*The Effects of Three Kinds Herbal Combination A, B and C
Administration Towards Macrophage Phagocytosis Index and ROI
Production In Mice BALB/c.*

JURNAL MEDIA MEDIKA MUDA

**Disusun untuk memenuhi sebagian persyaratan
guna mencapai gelar sarjana strata-1 kedokteran umum**

**AKHSANANTA LIAN FERDIANSYAH
22010110120004**

**PROGRAM PENDIDIKAN SARJANA KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
TAHUN 2014**

LEMBAR PENGESAHAN JURNAL MEDIA MEDIKA MUDA

**PENGARUH PEMBERIAN TIGA JENIS KOMBINASI
HERBAL A, B DAN C TERHADAP INDEKS FAGOSITOSIS
MAKROFAG DAN PRODUKSI ROI PADA MENCIT BALB/C**

Disusun oleh:

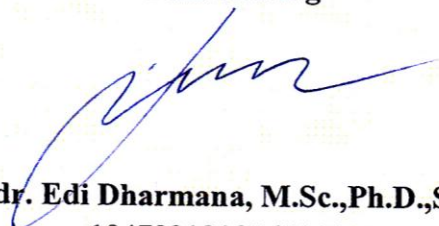
AKHSANANTA LIAN FERDIANSYAH

22010110120004

Telah disetujui

Semarang, 18 Juli 2014

Pembimbing



Prof. dr. Edi Dharmana, M.Sc., Ph.D., Sp.ParK

194703121976031001

Ketua Penguji



dr. Ratna Damma Purnawati, M.Kes

196311141990032001

Penguji



dr. Sudaryanto, M.Pd. Ked.

197004161997021001

PENGARUH PEMBERIAN TIGA JENIS KOMBINASI HERBAL A,B DAN C TERHADAP INDEKS FAGOSITOSIS MAKROFAG DAN PRODUKSI ROI PADA MENCIT BALB/C

Akhsananta Lian Ferdiansyah¹, Edi Dharmana²

ABSTRAK

Latar Belakang: Respon imunitas tubuh yang baik diperlukan untuk mengatasi invasi patogen yang masuk seperti bakteri, virus dan jamur. Pemberian imunostimulan merupakan salah satu upaya yang dapat dilakukan dimana pada penelitian ini akan diteliti potensi tiga macam kombinasi herbal yang mengandung ekstrak tumbuh-tumbuhan yang menurut beberapa penelitian mampu meningkatkan sistem imunitas tubuh. Penelitian ini bertujuan untuk melihat respon imunitas melalui aktivitas makrofag dalam melakukan fagositosis terhadap lateks dan pengeluaran ROI yang merupakan metabolit oksidatif yang poten dalam membunuh mikroba.

Metode: Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan desain *Post Test-Only Controlled Group Design*. Sampel berupa 32 ekor mencit Balb/C yang dikelompokkan secara acak menjadi empat kelompok yaitu kelompok kontrol (K) yang diberikan aquades, dan kelompok perlakuan (P1,P2 dan P3) yang masing-masing diberikan kombinasi herbal A, B dan C dengan dosis 0,08 ml/hari melalui sonde lambung selama 7 hari. Penilaian dilakukan dengan cara membandingkan hasil antar kelompok. Makrofag yang digunakan didapatkan dari isolasi makrofag peritoneal mencit Balb/C.

Hasil: Pemberian kombinasi herbal A, B, dan C pada aktivitas fagositosis makrofag didapatkan perbedaan bermakna pada kelompok K-P1 ($p=0,027$), K-P2 ($p=0,000$) dan K-P3 ($p=0,024$) serta pada produksi ROI pada kelompok K-P1 ($p=0,004$), K-P2 ($p=0,006$) dan K-P3 ($p=0,006$). Kelompok perlakuan yang memiliki hasil paling signifikan dalam peningkatan indeks fagositosis adalah pada kelompok P2 dan pada kelompok P3 untuk produktivitas ROI.

Simpulan: Pemberian kombinasi herbal A, B dan C terbukti meningkatkan indeks fagositosis makrofag dan produksi ROI secara bermakna.

Kata kunci: Kombinasi herbal, fagositosis makrofag, ROI, imunostimulan

¹Mahasiswa program pendidikan S-1 Kedokteran Umum FK Undip

² Staf pengajar Bagian Parasitologi FK Undip, Jl. Dr.Sutomo No 18 Semarang

THE EFFECTS OF THREE KINDS HERBAL COMBINATION A, B AND C ADMINISTRATION TOWARDS MACROPHAGE PHAGOCYTOSIS INDEX AND ROI PRODUCTION IN MICE BALB/C

Akhsananta Lian Ferdiansyah¹, Edi Dharmana²

ABSTRACT

Background : A good immunity is needed to face the invasion of pathogen such as bacteria, viruses and fungus. Immunostimulant administration is one of the worth effort that could be done. The potency research of three kinds herbal combination that contain some herbal extracts which was in other research could increase the immune body system has been conducted. The aim of this research was to see the immune response through macrophage activity in phagocytosis of latex and ROI production which is a potent oxidative substance that killing microbe.

Method : This research was an experimental study using the post test only controlled group design. The samples were 32 Balb/C mice that randomly divided into four groups. One group was given only distilled water as control, and three treatment groups (P1,P2 and P3) were given herbal combination A, B and C in 0,08 ml/day via gastric sonde for 7 days. The result was evaluated by comparing the observation result in each groups. Macrophage that had been used in this research were isolated directly from peritoneal's macrophages of Balb/C mice.

Results : Herbal combination A, B and C administration showed a significant increased of macrophage's phagocytosis index in K-P1 group ($p=0,027$), K-P2 group ($p=0,000$) and K-P3 group ($p=0,024$) and significant increased of ROI production in K-P1 group ($p=0,004$), K-P2 group ($p=0,006$) and K-P3 group ($p=0,006$). Treatment group that gave the most significant result in increased phagocytosis index was P2 group and P3 group for ROI productivity.

Conclusion : Herbal combination A, B and C administration have been proven to show a significant increase of macrophage's phagocytosis index and ROI production,

Keyword : Herbal combination, macrophage's phagocytosis, ROI, Immunostimulant

¹Undergraduate student of Faculty of Medicine Diponegoro University

²Lecturer of Parasitology's Department Faculty of Medicine Diponegoro University

PENDAHULUAN

Sistem imunitas didalam tubuh manusia merupakan satu kesatuan yang kompleks dan berlapis-lapis dalam menghadapi invasi patogen yang masuk seperti bakteri, jamur, virus dan parasit. Respon imun spesifik dan non-spesifik diperlukan untuk mengatasi patogen yang menginfeksi. Salah satu upaya tubuh untuk mempertahankan diri dari masuknya antigen yaitu dengan cara menghancurkan antigen tersebut secara non-spesifik yang dikenal dengan proses fagositosis. Makrofag merupakan salah satu sel utama pertahanan non spesifik yang melakukan fagositosis yaitu melalui pengenalan, pengikatan, endositosis, fusifagosom, pemusnahan dan pencernaan bakteri.¹ Selama proses fagositosis berlangsung, akan terjadi *Respiratory burst* yaitu dilepaskannya ROI atau metabolit oksigen yang akan berperan membunuh patogen yang merusak tubuh.²

Penelitian ini akan meneliti sel fagosit seperti makrofag dan hasil produksinya yaitu *Reactive Oxygen Intermediate* (ROI) yang keduanya merupakan kunci penting dalam respon imun non-spesifik. Makrofag akan mencerna dan mengenalkan patogen yang masuk kepada limfosit T yang selanjutnya akan menstimulasi Th1 untuk sintesis IFN- γ , TNF- α dan sitokin pro inflamasi seperti IL-1 serta menstimulasi Th2 untuk membentuk antibodi dan sitokin antiinflamasi.³

Respon imunitas tubuh yang baik diperlukan untuk mengatasi suatu infeksi atau keganasan. Pemberian imunostimulan merupakan salah satu upaya yang dapat dilakukan. Peneliti ingin meneliti potensi ketiga macam kombinasi herbal yaitu kombinasi herbal A , herbal B dan herbal C yang ketiganya mengandung ekstrak dari berbagai macam bahan tradisional antara lain *Zingiberis rhizoma*(Jahe), *Caryophylli folium*(Daun cengkeh), *Myristicae semen*(pala), *Parkiae semen*(kedawung) *Amomi fructus*(Kapulogo), *Usneae thallus*(Kayu angin), *Methae arvensitis herba*(Daun mint) dan *Centellae herba*(pegagan) yang pada penelitian sebelumnya telah terbukti meningkatkan sistem imunitas tubuh.⁴ Penggunaan komposisi dan kadar yang berbeda pada beberapa bahan diharapkan mampu lebih meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag dan produksi dari ROI.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan *Post Test Only Group Design*. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta pada bulan Juni sampai Juli 2014. Sampel dipilih dengan cara *simple random sampling*. Subjek penelitian adalah Mencit BALB/C.

Penelitian ini menggunakan 32 ekor mencit BALB/C sebagai subjek penelitian. Penentuan besar sampel ditentukan sesuai ketentuan WHO, yakni jumlah sampel minimal 5 ekor tikus tiap kelompok yang diambil secara acak. Sampel dibagi menjadi empat kelompok yaitu satu kelompok kontrol dan tiga kelompok perlakuan. Kelompok kontrol merupakan subjek penelitian yang hanya diberikan aquades sedangkan kelompok perlakuan diberikan masing-masing kombinasi herbal A, herbal B dan herbal C selama satu minggu dengan dosis 0,08 ml/hari/mencit. Terminasi mencit dilakukan pada hari ke tujuh untuk diisolasi makrofag peritonealnya dengan metode Lewis J.G dan kemudian dilakukan penghitungan indeks fagositosis makrofag menggunakan metode modifikasi Neldon DL dkk pada “Fagositosis sel darah merah domba oleh makrofag” dan produksi ROI dihitung dengan menggunakan metode Leijh.

Kriteria inklusinya adalah mencit BALB/C betina, dewasa usia 8 minggu, berat badan 20-40 gram dan kondisi sehat sedangkan kriteria eksklusi adalah mencit yang mati selama penelitian. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah kombinasi herbal A, kombinasi herbal B dan kombinasi herbal C dengan variabel terikatnya yaitu indeks fagositosis makrofag dan produksi ROI.

Analisis data secara statistik dilakukan menggunakan program *SPSS 16.00 for Windows*. Uji yang digunakan adalah uji parametrik *ANOVA* jika didapat sebaran data yang normal dan uji non-parametrik *Kruskal-Wallis* ketika didapatkan sebaran data yang tidak normal.

HASIL

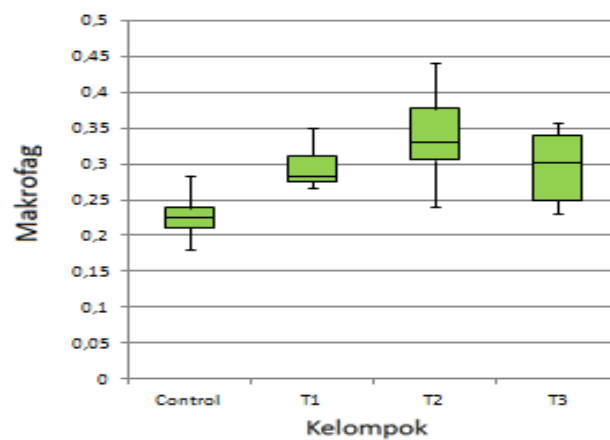
Populasi sampel penelitian ini adalah mencit BALB/C betina yang memenuhi kriteria inklusi penelitian, diambil dengan metode *simple random sampling* dan dikembangkan di LPPT UGM Unit IV. Selama penelitian tidak ditemukan sampel yang *drop-out*.

Data *post-test* Indeks fagositosis makrofag yang diperoleh dari keempat kelompok (K, P1, P2, P3) terdistribusi normal berdasarkan uji normalitas *Saphiro-wilk* ($p>0,05$).

Tabel 1. Rerata indeks fagositosis makrofag

Kelompok	Mean \pm Std. Deviasi	Uji <i>Shapiro –wilk</i>
Kontrol (K)	0,2275 \pm 0,332	0,785*
Herbal A (P1)	0,2950 \pm 0,285	0,185*
Herbal B (P2)	0,3362 \pm 0,622	0,776*
Herbal C (P3)	0,2962 \pm 0,483	0,340*

Dari hasil tabel diatas didapatkan nilai rerata kelompok perlakuan (P) lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol (K) dengan nilai rerata tertinggi yaitu pada kelompok P2 yaitu 0,3362.



Gambar 1. Boxplot indeks fagositosis makrofag

Uji parametrik dapat dilakukan jika didapatkan sebaran data yang normal dan data yang didapatkan homogen. Uji *Levenne test* dilakukan untuk mendapatkan homogenitas data dan didapatkan nilai $p=0,185$. Data yang didapatkan homogen karena $p>0,05$. Persyaratan memenuhi sehingga uji parametrik one-way ANOVA dapat dilakukan dan didapatkan nilai signifikan ($p<0,05$) yaitu $p=0,001$. Ini menjelaskan bahwa sedikitnya terdapat 2 kelompok yang memiliki perbedaan yang signifikan. Kelompok mana yang memiliki perbedaan signifikan dapat diketahui dengan melakukan uji analisis *Post-hoc*.

Tabel 2. Hasil Uji *Post-hoc*

Kelompok	Uji <i>Post-hoc</i>
K-P1	0,027
K-P2	0,000
K-P3	0,024
P1-P2	0,281
P1-P3	1,000
P2-P3	0,306

Berdasarkan tabel hasil uji *post-hoc*, nilai p untuk setiap kelompok dibandingkan satu sama lain. Perbedaan yang signifikan terjadi pada kelompok K-P1 , K-P2 dan K-P3 yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan dari kelompok kontrol (K) dibandingkan kelompok perlakuan 1 (P1) , kelompok kontrol (K) dibandingkan kelompok perlakuan 2 (P2) dan kelompok kontrol (K) dibandingkan kelompok perlakuan 3 (P3).

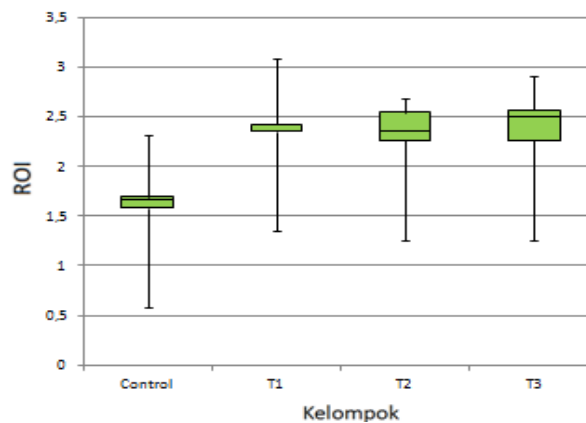
ROI atau *Reactive Oxidative Intermediate* merupakan hasil produksi makrofag yang berperan dalam *respiratory burst*. Sampel yang digunakan 7 ekor mencit dengan total berjumlah 28 ekor mencit Balb/C. Penghitungan ROI dapat dilihat dari presipitat butir formazan yang terbentuk akibat reaksi reduksi superoksida terhadap reagen NBT. Sediaan dibaca pada 50 sel makrofag dan dihitung berdasarkan jumlah sel yang ada dikalikan derajat masing-masing, kemudian dibagi dengan total jumlah sel yang ada.

Data *post-test* produksi ROI yang diperoleh dari ketiga kelompok perlakuan (P1, P2, P3) terdistribusi normal dan kelompok kontrol (K) terdistribusi tidak normal berdasarkan uji *shapiro-wilk* dengan nilai $p=0,009$ ($p<0,05$).

Tabel 3. Analisa deskriptif hasil persentase derajat presipitat

Kelompok	Mean	Median	Uji <i>Shapiro –wilk</i>
K (Aquades)	1,71±0,28	1,66	0,009
P1 (Herbal A)	2,43±0,32	2,42	0,054*
P2 (Herbal B)	2,39±0,19	2,36	0,815*
P3 (Herbal C)	2,46±0,24	2,50	0,446*

Tabel diatas menunjukkan nilai rerata persentase derajat presipitat pada masing-masing kelompok perlakuan. Kelompok kontrol didapatkan nilai rerata 1,71% ± 0,28, kelompok P1 (herbal A) menunjukkan nilai rerata 2,43% ± 0,32, kelompok P2 (herbal B) didapatkan nilai rerata 2,39% ± 0,19 dan kelompok P3 (herbal C) dengan nilai rerata 2,46% ± 0,24.



Gambar 2. Boxplot derajat presipitat ROI

Sebaran yang tidak normal mengakibatkan tidak dapat digunakannya uji parametrik. Transformasi data dilakukan namun data tetap berdistribusi tidak normal maka dilanjutkan ke uji non-parametrik *Kruskal-Wallis*. Perbedaan yang signifikan didapatkan dari rata-rata rangking antar kelompok kontrol dan perlakuan. Hal ini terlihat dari nilai $p=0,007$, karena nilai $p<0,05$ maka minimal terdapat 2 perbedaan yang bermakna antar kelompok yang diuji. Uji *Mann-Whitney* dilakukan untuk melihat kelompok mana yang memiliki perbedaan yang bermakna. Hasilnya sebagai berikut.

Tabel 4. Hasil Uji *Mann-Whitney*

Kelompok	K	P1	P2	P3
K	-	0,004*	0,006*	0,006*
P1	-	-	0,897	0,698
P2	-	-	-	0,701
P3	-	-	-	-

Tabel diatas menunjukkan nilai p perbandingan antara satu kelompok dengan kelompok yang lain. Perbedaan dianggap bermakna jika didapatkan nilai $p<0,05$. Perbedaan yang signifikan terjadi pada kelompok Kontrol dengan kelompok P1 (herbal A), kelompok Kontrol dengan kelompok P2 (Herbal B), dan kelompok Kontrol dengan Kelompok P3 (Herbal C).

PEMBAHASAN

Aktivitas fagositosis terhadap lateks dan produksi ROI oleh makrofag peritoneal telah diteliti pada penelitian ini. Berdasarkan skor rerata pada kedua variabel, didapatkan kelompok perlakuan memiliki skor lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol. Nilai rerata dari aktivitas fagositosis makrofag tertinggi adalah pada kelompok perlakuan dua yaitu mencit yang diberikan kombinasi herbal B sedangkan untuk produktivitas ROI tertinggi pada kelompok perlakuan tiga yaitu mencit yang diberikan kombinasi herbal C. Hal ini menjawab hipotesis bahwa terdapat perbedaan potensi pengaruh kombinasi herbal A, herbal B dan herbal C terhadap indeks fagositosis makrofag dan produksi ROI pada mencit Balb/C

Peningkatan aktivitas makrofag dan produksi ROI ditemukan bermakna pada ketiga kelompok perlakuan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol yaitu yang diberikan kombinasi herbal A, kombinasi herbal B, dan kombinasi herbal C. Penelitian sebelumnya oleh Dharmana E, Susilaningsih N dan Wijayahadi N, didapatkan peningkatan aktivitas fagositosis makrofag dan produksi dari ROI dengan menggunakan kombinasi herbal⁵ dimana beberapa bahan yang terkandung didalamnya juga terdapat pada kombinasi herbal A, herbal B dan herbal C. Penelitian lain yang dilakukan oleh Meika D pada pemberian simunox dosis bertingkat terhadap fungsi fagositosis makrofag juga ditemukan peningkatan yang bermakna pada dosis 0,08 ml/hari⁶ dimana simunox memiliki komposisi yang sama dengan kombinasi herbal A ditambah *Phyllanthi herba* (meniran).

Sebagian besar bahan herbal yang terkandung memiliki efek bakterisidal melalui peningkatan aktivitas fagositosis makrofag dan pengeluaran ROI. Pegagan yang terkandung pada kombinasi herbal A berfungsi sebagai imunostimulan yang kuat,⁷ kapulogo yang menghambat aktivitas bakteri dan fungi seperti *Trichophyton rubrum*, *Microsporum gypseum*, *Staphylococcus aureus*, dan *Enterococcus faecalis*.⁸ Cengkeh dapat berperan dalam aktivitas antimikrobal, antiviral, antiinflamatori, dan antioksidan.⁹ Biji pala yang mengandung agen stimulan juga dapat meningkatkan fungsi dari limpa dan sebagai antioksidan.¹⁰

Akar alang-alang, daun jungrahab dan *peppermint oil* merupakan bahan herbal yang baru pertama kali ini dikombinasikan dengan kombinasi herbal yang sudah pernah diteliti sebelumnya. Penelitian yang dilakukan oleh Khaerunnisa St tentang pemanfaatan senyawa bioaktif dari akar alang-alang seperti flavonoid yang berperan sebagai anti oksidan.¹¹ Flavonoid seperti yang telah diketahui mampu mengirimkan sinyal intraseluler pada reseptor sel sehingga sel berfungsi optimal, termasuk makrofag sebagai sel fagosit.¹² Kombinasi herbal B selain menggunakan akar alang-alang juga menggunakan *peppermint oil* yang pada penelitian sebelumnya oleh Schuhmacher A dapat berperan sebagai antiviral terutama HSV 1 dan HSV 2,¹³ serta pada penelitian oleh Imai H, *peppermint oil* dapat menghambat pertumbuhan dari bakteri patogen.¹⁴ Daun jungrahab yang digunakan pada kombinasi herbal C pada penelitian yang dilakukan oleh Yusuf *et al* digunakan sebagai diuretik, obat untuk mengatasi lelah, ngilu dan perut nyeri.¹⁵

Peningkatan aktivitas makrofag dalam melakukan fagositosis akan berbanding lurus dengan pengeluaran zat oksidatifnya seperti ROI.¹⁶ Hasil pada penelitian ini didapatkan peningkatan tertinggi aktivitas fagositosis makrofag yaitu pada kelompok dengan pemberian kombinasi herbal B sedangkan kelompok dengan kombinasi herbal C merupakan kelompok tertinggi pada produktivitas ROI. Hal ini dapat dikarenakan ROI merupakan molekul yang tidak stabil dan dapat dipengaruhi oleh bermacam-macam hal¹⁷ seperti pada penelitian Devasagayam *et al* tentang radikal bebas dan antioksidan didapatkan hasil yaitu ROI dapat meningkat secara signifikan ketika terjadi stres terhadap lingkungan seperti paparan panas atau UV.¹⁸

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

1. Pemberian kombinasi herbal A, herbal B dan herbal C terbukti memberikan perubahan pada aktivitas fagositosis makrofag dan produksi ROI mencit Balb/C yaitu peningkatan yang bermakna jika dibandingkan kelompok kontrol yang hanya diberikan aquades.
2. Pemberian ketiga kombinasi herbal ini juga memiliki potensi yang berbeda bermakna dalam mempengaruhi aktivitas fagositosis makrofag dan produksi ROI pada mencit Balb/C dibandingkan kelompok kontrol yang hanya diberikan aquades.

Saran

1. Disarankan untuk penelitian selanjutnya adalah menggunakan dosis yang bervariasi pada setiap kombinasi herbal agar dapat diketahui dosis yang paling efektif untuk masing-masing kombinasi herbal tersebut.
2. Peningkatan dari waktu masa perlakuan sebaiknya dilakukan untuk mengetahui perbedaan dari indeks fagositosis makrofag dan produksi ROI terhadap penelitian ini.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Prof.Edi Dharmana, M.Sc, PhD, Sp.Park sebagai Pembimbing yang telah banyak banyak meluangkan waktu, tenaga dan pikirannya untuk membimbing dan memberikan pengarahan dalam menyusun karya tulis ilmiah ini dan kepada dr. Neni Susilaningsih M.Si yang selalu menemani peneliti selama penelitian dan memberikan arahan selama penelitian. Peneliti juga mengucapkan terima kasih kepada dr. Ratna Damma Purnawati, M.Kes selaku ketua penguji dan dr. Sudaryanto M.Pd. Ked, selaku penguji, serta pihak-pihak lain yang telah membantu hingga penelitian ini dapat terlaksana dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

1. Baratawidjaja K, Rengganis I. *Imunologi Dasar*, Edisi Kedelapan. Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Indonesia; 2009.
2. Munandar Riza S. Pengaruh Pemberian Simunox Dosis bertingkat terhadap kadar *Reactive Oxygent Intermediate* (ROI) pada mencit *swiss*. Semarang: Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro; 2010.
3. Davidson College biology department. *Innate Immune Response* [homepage on the internet]. c2007 [cited 2007 by Dr.Sophia Sarafova]. Available from: <http://www.bio.davidson.edu/people/sosarafova/assets/bio307/emrivard/Innate%20Immune%20Response.html>
4. Tolak Angin- Tolak Angin Anak. Obat Herbal Terstandard Tolak Angin. Available from: <http://xa.yimg.com/kq/groups/78262509/931225350/name/TA-TAA-SARI.pdf>
5. Dharmana E, Susilaningsih N , Wijayahadi N. Pengaruh Pemberian Tolak Angin Anak terhadap Proliferasi limfosit, Produksi IFN- γ , Fungsi fagositosis Makrofag dan Produksi ROI. Semarang: Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro; 2009.
6. Meika D. Pengaruh Pemberian Simunox Dosis Bertingkat terhadap Fungsi Fagositosis Makrofag pada Mencit Swiss. 2010
7. Panda H. *Hand Book on Herbal Medicines*. Gramedia; 2004
8. Sheng zhang, Wang zhao-yu, Wang tie-shang, Li miao-xia. Composition and Antimicrobial Activities of Essential Oil of Fructus Amomi. *Natural Product Research & Development*. Vol. 23 Issue 3, pp 464 – 472; 2011.
9. World Health Organization. *Caryophilli flos*. 2004. Available from: <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js4927e/7.html>
10. Akinboro A dkk. Mutagenic and antimutagenic assessment of methanol leaf extract of *Myristica fragrans* (Houtt.) using in vitro and in vivo genetic assays. *Drug Chem Toxicol*. Oct;35(4), pp 412 – 422; 2012
11. Khaerunnisa, ST. Application of Bioactive Compound From Root of Alang-Alang as antioxidant. Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Airlangga University; 2009.

12. Meniran Tanaman Pemacu Kekebalan Tubuh [cited 2014 July 07]. Available from: <http://Stimuno.com>
13. Schuhmacer A. Virucidal effect of peppermint oil on the enveloped viruses herpes simplex virus type 1 and type 2 in vitro. *Phytomedicine*. pp 504–510; 2003
14. Imai H. Inhibition by the essential oils of peppermint and spearmint of the growth of pathogenic bacteria. *Microbios*. pp 31-39; 2001.
15. Sunarti S. Jungrahab : The Only Medicinal Plant of Baeckeae in Indonesia and Its Collection at Herbarium Bogoriense. LIPI Bogor; 2011.
16. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology, Sixth Edition. Philadelphia: Elsevier-Saunders; 2007.
17. Wikipedia free ensiklopedia. ROS [last modified: 9 june 2014]. Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/Reactive_oxygen_species
18. Devasagayam, Tilak JC, Boloor KK, Sane Ketaki S, Ghaskadbi Saroj S, Lele RD. Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. *Journal of Association of Physicians of India (JAPI)* **52**: 796; 2004